

VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ – TECHNICKÁ UNIVERZITA
OSTRAVA

Univerzitní studijní programy

Nanotechnologie

Antibakteriální kompozity chlorhexidin/kaolinit

Antibacterial chlorhexidine/kaolinite composites

Student:

Veronika Kadlecová

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Sylva Holešová, Ph.D.

Ostrava 2014

Zadání bakalářské práce

Student: **Veronika Kadlecová**

Studijní program: B3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie

Téma: **Antibakteriální kompozity chlorhexidin/kaolinit**
Antibacterial chlorhexidine/kaolinite composites

Zásady pro vypracování:

Cílem bakalářské práce bude příprava několika typů kompozitů kaolinitu s aktivní složkou chlorhexidinem a porovnání jejich antibakteriálních vlastností. Součástí experimentu bude charakterizace připravených materiálů pomocí XRD, IR a SEM. V teoretické části práce bude kladen důraz na literární rešerši dle přiložené osnovy.

Doporučený obsah teoretické a experimentální části práce:

- Struktura a klasifikace jílových minerálů
- Kaolinit, exfoliace/delaminace pomocí malých organických molekul
- Antibakteriální kompozity na bázi jílu (anorganické, organické)
- Chlorhexidin - vlastnosti a použití
- Experimentální příprava kompozitů
- Charakterizace kompozitů pomocí XRD, IR a SEM
- Stanovení a porovnání antibakteriálních vlastností připravených kompozitů.

Seznam doporučené odborné literatury:

- [1] Z. Weiss, M. Kužvart, Jílové minerály: Jejich nanostruktura a využití. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 278 s. ISBN 80-246-0868-5.
- [2] M. Valášková, Vybrané vrstevnaté minerály a jejich modifikované nanomateriály. 1. vyd. Brno: CERM Akademické nakladatelství, s.r.o., 2012, 148 s. ISBN 978-80-7204-811-3.
- [3] R. Patakfalvi, I. Dekany, Synthesis and intercalation of silver nanoparticles in kaolinite/DMSO complexes, Appl. Clay Sci. 25 (2004) 149–159.
- [4] M. Valášková, M. Rieder, V. Matějka, P. Čapková, A. Slíva, Exfoliation/delamination of kaolinite by low-temperature washing of kaolinite-urea intercalates, Appl. Clay Sci. 35 (2007) 108–118.
- [5] S. Holešová, M. Valášková, E. Plevová, E. Pazdziora, K. Matějová, Preparation of novel organovermiculites with antibacterial activity using chlorhexidine diacetate, J. Colloid Interface Sci. 342 (2010) 593–597.

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Sylva Holešová, Ph.D.**

Datum zadání: 21.10.2013

Datum odevzdání: 15.05.2014



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry



prof. Ing. Petr Noskovič, CSc.
prorektor pro studium

Místopřísežné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a že všechny použité podklady a literární zdroje jsem správně a úplně citovala.

V Ostravě dne 15. 5. 2014

.....

Podpis autora

Prohlášení

Prohlašuji, že

- jsem byla seznámena s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. – autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního (§ 60 – školní dílo);
- беру на вѣдомі, že Vysoká škola Báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB – TUO) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§ 35 odst. 3);
- souhlasím s tím, že bakalářská práce bude archivována v elektronické formě v databázi Ústřední knihovny VŠB – TUO a jeden výtisk bude uložen u vedoucí bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o bakalářské práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO;
- bylo sjednáno, že s VŠB – TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB – TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, který byly VŠB – TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do její skutečné výše);
- беру на вѣдомі, že odevzdáním své bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (Zákon o vysokých školách) bez ohledu na výsledek obhajoby.

V Ostravě dne 15. 5. 2014

.....

Podpis (jméno a příjmení studenta)

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své práce Ing. Sylvě Holešové, Ph.D., nejen za odborný přístup, připomínky a cenné rady, které mi v průběhu psaní práce poskytla, ale také za ochotu a trpělivost, jimiž mě při psaní této bakalářské práce provázela.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou a charakterizací antibakteriálních kompozitů chlorhexidin/kaolinit. Byly připraveny dvě série kompozitních materiálů. V prvním případě slouží jako nosná matrice antibakteriálního léčiva jílový minerál kaolinit a ve druhém případě je to kaolinit modifikovaný dimethyl sulfoxidem. V obou sériích působí jako aktivní antibakteriální složka chlorhexidin dihydrochlorid. Připravené vzorky byly charakterizovány pomocí rentgenové difrakce (RTG), infračervené spektroskopie (IČE) a skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Antibakteriální účinnost připravených kompozitů byla testována proti kmenům *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* a dále proti kvasince *Candida albicans* a byla vyhodnocena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC).

Bylo zjištěno, že všechny připravené kompozitní materiály mají výbornou schopnost inhibovat bakteriální, ale i kvasinkový růst a jsou tedy antimikrobiálně velmi účinné.

Klíčová slova: kaolinit, chlorhexidin dihydrochlorid, dimethyl sulfoxid, antibakteriální účinek

Bibliografická citace:

KADLECOVÁ, Veronika. *Antibakteriální kompozity chlorhexidin/kaolinit*. Ostrava, 2014. 47 s. Bakalářská práce. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Ing. Sylva Holešová, Ph.D.

Abstract

This bachelor thesis is focused on the preparation and characterization of the antibacterial chlorhexidine/kaolinite composites. Two series of composite materials were prepared. In the first case, kaolinite was used as the carrier for antibacterial drug and in the second case, kaolinite modified with dimethyl sulfoxide was used. In both series chlorhexidine dihydrochloride acts as an active antibacterial component. The resultant samples were characterized by X – ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (IR) and scanning electron microscopy (SEM). The antibacterial activity of prepared composites against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and against yeast *Candida albicans* were evaluated by finding minimum inhibitory concentration (MIC).

It was found that all prepared composites have an excellent ability to inhibit bacterial moreover yeast growth and therefore they are very antimicrobial effective.

Keywords: kaolinite, chlorhexidine dihydrochloride, dimethyl sulfoxide, antibacterial activity

Reference format:

KADLECOVÁ, Veronika. *Antibacterial chlorhexidine/kaolinite composites*. Ostrava, 2014. 47 p. Bachelor thesis. VŠB - Technical University of Ostrava. Supervisor Ing. Sylva Holešová, Ph.D.

Obsah

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Úvod | 12 |
| 2 | Cíl práce..... | 13 |
| 3 | Teoretická část..... | 14 |
| 3.1 | Struktura a klasifikace jílových minerálů | 14 |
| 3.1.1 | Jílové minerály..... | 14 |
| 3.1.2 | Strukturní charakteristiky | 14 |
| 3.1.2.1 | Tetraedrická síť | 15 |
| 3.1.2.2 | Oktaedrická síť..... | 16 |
| 3.1.2.3 | Vzájemné propojení oktaedrických a tetraedrických sítí..... | 17 |
| 3.1.2.4 | Mezivrstvi | 18 |
| 3.1.2.5 | Klasifikace vrstevnatých silikátů | 18 |
| 3.2 | Kaolinit..... | 19 |
| 3.2.1 | Modifikace kaolinitu..... | 20 |
| 3.2.1.1 | Interkalace..... | 20 |
| 3.2.1.2 | Exfoliace/delaminace kaolinitu pomocí malých organických molekul | 21 |
| 3.3 | Antibakteriální kompozity na bázi jílu..... | 22 |
| 3.3.1 | Anorganické antibakteriální kompozity na bázi jílu..... | 22 |
| 3.3.2 | Organické antibakteriální kompozity na bázi jílu..... | 24 |
| 3.4 | Chlorhexidin..... | 25 |
| 3.5 | Vybrané mikrobiální kmeny | 26 |
| 4 | Experimentální část | 29 |
| 4.1 | Příprava antibakteriálních kompozitů | 29 |
| 4.1.1 | Použité chemikálie..... | 29 |
| 4.1.2 | Exfoliace/delaminace kaolinitu pomocí DMSO | 29 |
| 4.1.3 | Interkalace antibakteriální sloučeniny | 29 |
| 4.2 | Metody identifikace a jejich nástroje | 30 |
| 4.2.1 | Rentgenová difrakční analýza..... | 30 |
| 4.2.2 | Infračervená spektroskopie | 30 |
| 4.2.3 | Skenovací elektronová mikroskopie | 30 |
| 4.3 | Antibakteriální testy | 31 |
| 4.3.1 | Pracovní postup..... | 31 |
| 5 | Výsledky a diskuze..... | 32 |
| 5.1 | Vyhodnocení struktury antibakteriálních kompozitů..... | 32 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.1.1 | Rentgenová difrakční analýza..... | 32 |
| 5.1.2 | Infračervená spektroskopie | 35 |
| 5.1.3 | Skenovací elektronová mikroskopie | 38 |
| 5.2 | Zhodnocení antibakteriálních testů | 38 |
| 6 | Závěr..... | 42 |
| 7 | Literatura | 44 |

Seznam zkratk

| | |
|------|---|
| CA | chlorhexidin diacetát |
| CCM | Česká sbírka mikroorganismů |
| CH | chlorhexidin dihydrochlorid |
| CP | cetylpyridinium |
| CTA | cetyltrimethylamonium |
| DMSO | dimethyl sulfoxid |
| FTIR | infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací |
| IČE | infračervená spektroskopie (<i>angl. IR</i>) |
| KAO | kaolinit |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace |
| MMT | montmorillonit |
| RTG | rentgenová difrakce (<i>angl. XRD</i>) |
| SE | sekundární elektrony |
| SEM | skenovací elektronová mikroskopie |
| SSA | specifický povrch |
| VER | vermikulit |

1 Úvod

Z historického hlediska byl vývoj nových materiálů jedním z nejdůležitějších úkolů lidstva. Ať už šlo o první pokusy využívat kamenné nástroje, vypalovat hlínu či slévat bronz, vždy se tím významně ovlivnil vývoj lidské společnosti a celé civilizace. Postupem času přestaly lidem surové materiály stačit a začaly se vyvíjet materiály nové, s lepšími vlastnostmi.

V novodobé éře se velká část lidského výzkumu zaměřuje na vývoj kompozitních materiálů, jejichž specifické vlastnosti jim předurčují široké pole využití. Kompozitní materiály jsou složeny ze dvou nebo více odlišných materiálů, jejichž výhody v sobě kombinují a nevýhody potlačují. Obecně se kompozitní materiály skládají z matrice a plniva neboli aktivní látky, která dodává materiálu požadovanou novou vlastnost.

V poslední době se rychle rozvíjí vývoj antibakteriálních kompozitů s jílovou maticí. Jílové minerály jsou vhodné převážně pro jejich nulovou toxicitu, vysokou stabilitu a schopnost vázat do své struktury jiné látky. Velkou výhodou těchto materiálů je možnost jejich využití v běžně využívaných výrobcích, jako jsou nátery, kuchyňské nádobí či nemocniční potřeby, kde je pravděpodobnost výskytu bakterií vysoká. Antibakteriální jíly je také možné využít pro výrobu lokálně a dlouhodobě působících preparátů, využitelných například pro léčení v dutině ústní.

V mé bakalářské práci se věnuji přípravě a charakterizaci antibakteriálních kompozitních materiálů, kdy funkční komponentou těchto kompozitů je molekula chlorhexidinu (ve formě dihydrochloridu), jež je kotvena na nosič – jílový minerál kaolinit. Právě chlorhexidin je v současné době hojně využíván jako aktivní složka v ústních vodách nebo například při léčbě zánětů dásní. Ukotvením léčiva na vhodný nosič můžeme zajistit transport na určené místo v organismu, postupné uvolňování, a tudíž minimalizovat vedlejší účinky.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce byla příprava kompozitů chlorhexidin/kaolinit s antibakteriálními účinky a to dvěma odlišnými postupy. Následovalo porovnání jejich antibakteriálních vlastností, které byly stanoveny pro dva běžně se vyskytující bakteriální kmeny (*S. aureus* a *E. coli*) a dále pro kvasinku *Candida albicans*, jež se účastní převážné části mykotických onemocnění dutiny ústní. Dále byly použity základní metody pro charakterizaci struktury připravených materiálů zahrnující RTG, IČE a SEM.

V teoretické části byl kladen důraz na literární rešerši týkající se antibakteriálních kompozitů na bázi jílu, klasifikaci jílových minerálů a jejich strukturních charakteristik.

3 Teoretická část

3.1 Struktura a klasifikace jílových minerálů

3.1.1 Jílové minerály

Jednou z prvních surovin, kterou se naučilo lidstvo využívat, jsou nepochybně jílové minerály. Ty patří mezi nejrozšířenější minerály v horninotvorném systému zemské kůry a jsou podstatnou částí půdního horizontu [1]. Náleží do skupiny sekundárních minerálů, které vznikají v půdotvorném procesu rozpadem primárních křemičitanů [2].

Termínem jíl označujeme směsný přírodní materiál, primárně složený z jemně zrnitých minerálů, který je při přiměřeném obsahu vody obecně plastický a ztvdne po vysušení či vypálení. Termín jílový minerál se vztahuje k těm minerálům obsaženým v jílech, které jim udělují plasticitu a které se vytvrzují po vysušení či vypálení [3]. Mimo nejrozšířenější složku jílových minerálů, kterou jsou fylosilikáty (vrstevnaté silikáty), lze mezi ně řadit také minerály skupiny alofánu či některé hydroxidy, oxy-hydroxidy a oxidy. Ty jsou ale pouze jejich minoritní složkou [1].

Jílové minerály jsou studovány převážně díky jejich následujícím vlastnostem:

- **Schopnost vázat vodu**

Jílové minerály mohou vázat vodu dvojím způsobem. Jako molekuly H_2O v pórech mezi částicemi a sorbované na povrchu částic, nebo jako hydroxylové skupiny OH^- v hydratačních obalech vyměnitelných kationtů v mezivrstevním prostoru, což vede k oddalování vrstevních komplexů. Tento jev nazýváme bobtnání.

- **Schopnost sorpce a iontové výměny**

Vyměnitelné kationty mohou být do struktury jílových minerálů vázány pomocí adsorpce na povrch částic, nebo elektrostaticky do mezivrstevních prostor (absorpce). Vyměnitelné kationty mohou být u řady fylosilikátů snadno nahrazeny jiným kationtem. Množství a druh vyměnitelného kationtu výrazně ovlivňuje fyzikální vlastnosti jílových minerálů.

- **Reakce s organickými látkami**

Některé jílové minerály, zejména vermikulity a smektity, jsou schopny reagovat s organickými látkami za vzniku tzv. organo-jílových komplexů [4].

3.1.2 Strukturní charakteristiky

Nejvýznamnější skupinou obsaženou v zemské kůře jsou silikáty (křemičitany). Jejich strukturu tvoří tetraedry $[SiO_4]^{4-}$ a kationty (např. Al^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , K^+), které

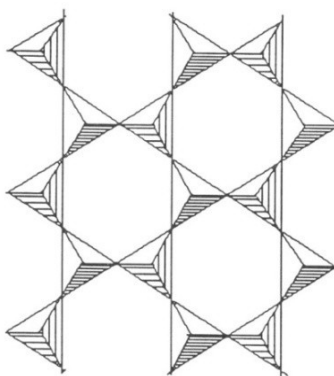
kompenzují jejich záporný náboj. Kompenzace záporného náboje může nastat také vzájemným řetězením tetraedrů.

Základními koordinačními polyedry, z nichž jsou struktury fylosilikátů vybudovány, jsou tetraedry $[\text{TO}_4]^{m-}$ a oktaedry $[\text{MA}_6]^{n-}$. Jako T jsou označeny centrální kationty tetraedrů, jako M centrální kationty oktaedrů a jako A anionty oktaedrů [1].

Oktaedry a tetraedry jsou vzájemně spojeny pomocí atomů kyslíku a vytvářejí síť [4]. Síť tetraedrů jsou spojeny se sítěmi oktaedrů sdílením aniontů a vytváří tak vrstvy. Vrstvy mohou být mezi sebou spojeny například systémem vodíkových vazeb, nebo skupinami kationtů s koordinační sférou, či jednotlivými kationty, a společně tak vytváří základní jednotku struktury. Prostor mezi dvěma vrstvami je označován jako mezivrství. V mezivrství je umístěn mezivrstevní materiál (soubor iontů, atomů nebo jejich hydratovaných forem, koordinačních polyedrů či jejich sítí.) [1].

3.1.2.1 Tetraedrická síť

Podle klasifikace silikátů, kterou zavedl Zoltai v roce 1960 [5], jsou fylosilikáty struktury s nekonečnými dvojrozměrnými sítěmi tetraedrů. V těchto sítích jsou tetraedry spojeny vysoce kovalentními vazbami přes vrcholy bazálních atomů kyslíku. Čtvrtý atom kyslíku (vrcholový) směřuje na libovolnou stranu kolmo na rovinu sítě tetraedrů. V tetraedrických sítích fylosilikátů se vyskytují tetraedry $[\text{SiO}_4]^{4-}$, $[\text{AlO}_4]^{5-}$ nebo $[\text{FeO}_4]^{5-}$. Izomorfní substituce Si^{4+} kationty Al^{3+} nebo Fe^{3+} v tetraedrech není náhodná a existuje v doménách. V ideálním případě má tetraedrická síť hexagonální symetrii (Obr. 1).



Obr. 1: Idealizovaná tetraedrická síť [6].

Experimentálně bylo zjištěno, že v důsledku rotace tetraedrů není tetraedrická síť hexagonální, ale dochází k její deformaci. Výška tetraedrické sítě je vzdálenost mezi průměrnou hodnotou vertikálních souřadnic atomů bazálních kyslíků a vrcholovými kyslíky [7].

3.1.2.2 Oktaedrická síť

Dalším základním stavebním prvkem jílových minerálů je síť oktaedrů $[MA_6]^{n-}$. Každý centrální atom (M) obklopuje šest kyslíkových nebo hydroxylových aniontů. Oktaedrická síť je tvořena dvěma těsně uspořádanými rovinami aniontů O^{2-} a OH^- . Vzdálenost mezi těmito rovinami se nazývá výška oktaedrické sítě. Oktaedry spolu sdílí nejen vrcholy, ale také polovinu hran [1, 7, 8]. V síti oktaedrů existují tři druhy centrálních pozic (označované jako M1, M2 a M3) [1, 8]. Podle způsobu obsazení centrálních pozic lze rozdělit oktaedrické síť na tři skupiny:

- **Homooktaedrické síť** – v každé trojici sousedících oktaedrů jsou obsazeny jejich centrální pozice stejným způsobem.

$$(M1 = M2 = M3)$$

- **Mesooktaedrické síť** – v každé trojici sousedících oktaedrů jsou dvě centrální pozice obsazeny stejným způsobem a třetí je obsazena způsobem jiným.

$$(M1 \neq M2 = M3, \text{ nebo } M2 \neq M1 = M3, \text{ nebo } M3 \neq M1 = M2)$$

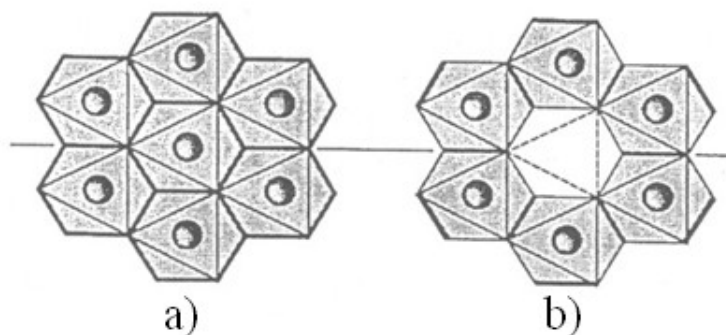
- **Heterooktaedrické síť** – v každé trojici sousedících oktaedrů jsou jejich centrální pozice obsazeny různým způsobem.

$$M1 \neq M2 \neq M3$$

Způsobem obsazení se rozumí, že centrální pozice může být obsazena konkrétním kationtem, nebo může být vakantní tj. neobsazená. Z hlediska obsazení či neobsazení centrálních pozic kationty můžeme oktaedrické síť dělit na:

- **Trioktaedrické** – všechny pozice M1, M2 a M3 jsou obsazeny kationty.
- **Dioktaedrické** – jedna z pozic M1, M2 a M3 je vakantní a další dvě jsou obsazené kationty.
- **Monoktaedrické** – dvě ze tří pozic M1, M2 a M3 jsou vakantní a jedna je obsazena kationty [1].

Způsob obsazení oktaedrických pozic (Obr. 2) a kvalita kationtů, jimiž jsou tyto pozice obsazeny, výrazně ovlivňuje velikost oktaedrů a míru jejich deformace.

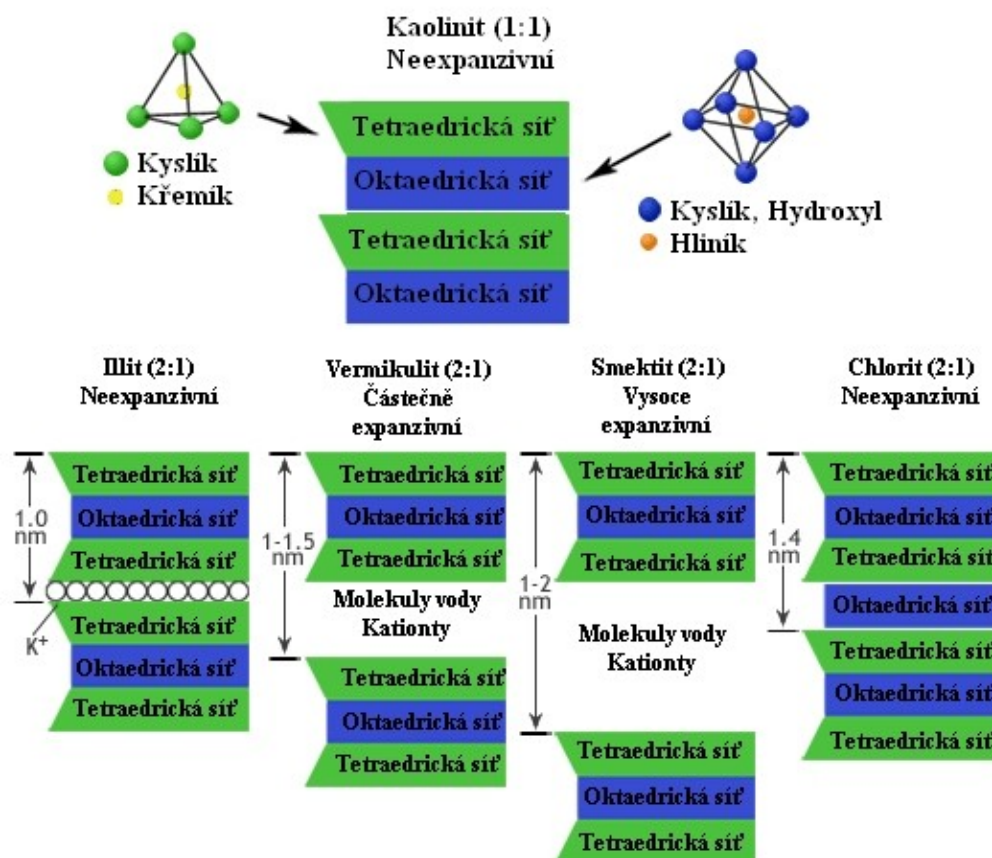


Obr. 2: Oktaedrická síť: a) trioktaedrická síť, b) dioktaedrická síť [9].

3.1.2.3 Vzájemné propojení oktaedrických a tetraedrických sítí

Ve strukturách fylosilikátů může docházet buď k propojení tetraedrické a oktaedrické sítě, nebo k propojení dvou tetraedrických sítí. Spojení dvou tetraedrických sítí je realizováno přes roviny bazálních kyslíků těchto sítí. Tetraedrické a oktaedrické sítě jsou spojeny přes společnou rovinu kyslíkových atomů, nebo jsou spojeny pomocí vodíkových vazeb mezi bazálními kyslíky tetraedrické sítě a rovinou aniontů OH^- oktaedrické sítě. Spojením oktaedrické a tetraedrické sítě přes rovinu kyslíkových atomů vznikají dva typy strukturních jednotek (Obr. 3), označovaných jako vrstvy:

- a) **Vrstvy 1:1** – jde o spojení jedné oktaedrické a jedné tetraedrické sítě, které mají jednu společnou rovinu kyslíkových atomů. Povrch 1:1 vrstev je tedy tvořen bazálními atomy kyslíků tetraedrické sítě a hydroxylovými OH^- skupinami oktaedrické sítě.
- b) **Vrstvy 2:1** – jde o spojení jedné oktaedrické a dvou tetraedrických sítí s opačnou polaritou. Tyto sítě mají společné dvě roviny kyslíkových atomů. Nesdílené atomy kyslíku v tetraedrech vytvářejí dvě roviny bazálních kyslíků [1].



Obr. 3: Schematické znázornění struktury jílových minerálů dle typu vrstev [10].

3.1.2.4 Mezivrství

Prostor mezi vrstvami ve struktuře fylosilikátů je označován jako mezivrství, které obsahuje tzv. mezivrstevní materiál. Může se jednat o jednomocné či dvojmocné kationty (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}), vytvářející koordinační sféry, samotné oktaedrické sítě, nebo hydratované vyměnitelné kationty [1, 7].

3.1.2.5 Klasifikace vrstevnatých silikátů

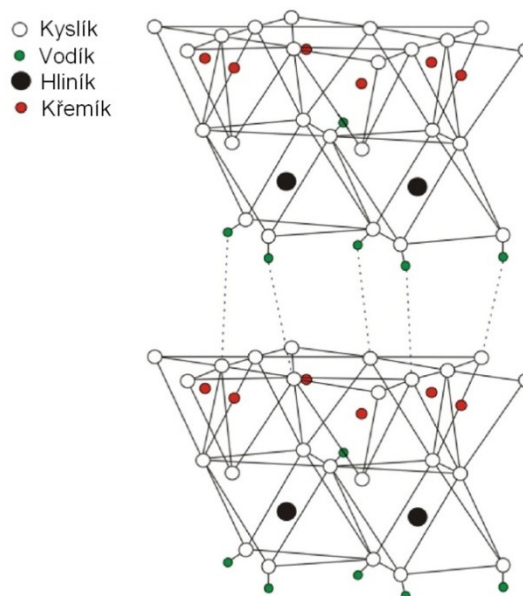
Fylosilikáty se klasifikují podle typu silikátových vrstev (1:1 nebo 2:1), náboje vrstvy a mezivrstevního materiálu. Každá skupina je dále rozdělena dle typu oktaedrické sítě na dioktaedrickou a trioktaedrickou podskupinu. Přehled klasifikace fylosilikátů je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1: Klasifikace fylosilikátů [1].

| Skupina | Typ vrstev | Typ oktaedrické sítě | Příklad |
|--------------------|------------|----------------------|---------------------------|
| serpentinu-kaolinu | 1:1 | tri- | lizardit, amesit, kellyit |
| | | di- | kaolini, dicktit, nakrit |
| mastku-pyrofylitu | 2:1 | tri- | mastek, kerolit |
| | | di- | pyrofylit |
| slíd | 2:1 | tri- | annit, biotit |
| | | di- | muskovit, illit |
| smektitů | 2:1 | tri- | saponit, hektorit |
| | | di- | montmorillonit |
| vermikulitů | 2:1 | tri- | trioktaedrický vermikulit |
| | | di- | dioktaedrický vermikulit |
| chloritů | 2:1 | tri-, tri- | pennin, nimit |
| | | di-, di- | donbasit |
| | | di-, tri- | cookeit, sudoit |

3.2 Kaolinit

Kaolinit patří mezi 1:1 fylosilikáty skupiny serpentinu-kaolinu. Jak z hlediska rozšíření v přírodě, tak z hlediska průmyslového využití patří k nejvýznamnějším fylosilikátům. Prvkové složení kaolinitu vyjádřené v oxidech je: 46.54 % SiO_2 , 39.50 % Al_2O_3 a 13.96 % H_2O . V přírodě se s kaolinitem velmi často vyskytují další oxidy Fe_2O_3 , TiO_2 , MgO a CaO . Krystalochemický vzorec základní strukturní jednotky kaolinitu je $\text{Si}_4\text{Al}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ [1, 7]. Kaolinit je tvořen siloxanovou vrstvou na síti tetraedrů $[\text{SiO}_4]$ uspořádaných v hexagonální symetrii. Siloxanová vrstva je vázána s vrstvou gibbsitového typu. Vrstva gibbsitového typu je tvořena sítí oktaedrů s centrálním atomem hliníku vázaným se čtyřmi jednotkami OH a dvěma atomy kyslíku [7]. Rovina aniontů oktaedrické sítě vrstvy 1:1, sousedící s tetraedrickou sítí následující vrstvy, je tvořena skupinami OH (Obr. 4), což je předpoklad pro existenci mezivrstevních vodíkových vazeb O-H...O [1].



Obr. 4: Schematické znázornění struktury kaolinitu [11].

V přírodě se kaolinit nejčastěji vyskytuje ve formě velmi jemně zrnitých agregátů, což způsobuje komplikace při získávání čisté suroviny, při průmyslovém využití a při výběru vhodných metod studia jeho struktury [1]. Průmyslové využití kaolinitu pokrývá širokou škálu aplikací – produkce keramiky, barviv, umělých hmot, atd. Jeho využití vymezují jeho fyzikálně-chemické, strukturní a povrchové vlastnosti.

3.2.1 Modifikace kaolinitu

Modifikací kaolinitu mohou být výrazně změněny jeho vlastnosti. Zejména velikost částic ovlivňuje disperzi, shlukování i jeho reologické vlastnosti. Mezi různé modifikační procesy patří např. aktivace mletím, modifikace kyselinami, exfoliace a delaminace, modifikace v ultrazvuku nebo interkalace a roubování. Jedná se o postupy, které vedou k zdrobňování a ztenčování destičkovitých částic. Takto upravený materiál se oproti původnímu mimo jiné vyznačuje větším specifickým povrchem (SSA) [7, 12].

3.2.1.1 Interkalace

Pro přípravu jílových nanokompozitů je nejvyužívanějším procesem interkalace [13]. Jedná se o proces, při kterém dochází k modifikaci materiálu, kdy se do vhodné hostitelské struktury vpraví atomy, ionty nebo molekuly jiné látky (hosta) [7]. Cílem obměny struktury je změna fyzikálních a chemických vlastností. Obzvláště vhodnou hostitelskou strukturou pro interkalaci jsou právě jílové minerály s vrstevnatou strukturou.

Mezi vrstvami kaolinitu se nacházejí silné vodíkové vazby, které zabraňují roztáhnutí těchto vrstev, proto mohou být do mezivrství kaolinitu interkalovány pouze některé malé polární organické molekuly (dimethyl sulfoxid, formamid, močovina, octan draselný, octan amonný) [7, 13], čehož se využívá k podpoření interkalace dalších molekul.

3.2.1.2 Exfoliace/delaminace kaolinitu pomocí malých organických molekul

Při procesu zmenšování částic dochází k jejich exfoliaci nebo delaminaci. Exfoliace je stupeň separace vrstev původního jílového minerálu neboli rozklad velkých agregátů na menší částice. Separované vrstvy jsou volné a na sobě nezávisle orientovány v disperzi, rozpouštědle nebo polymerní matrici. Delaminace je proces oddělování mezi rovinnými plochami sousedících vrstev, přičemž uložení vrstev je zachováno. Není-li experimentálně doloženo, že se jedná o postup exfoliace či delaminace, používá se označení exfoliace/delaminace nebo delaminace/exfoliace [7, 12].

Exfoliace/delaminace kaolinitu bývá často navázána na interkalaci malými organickými molekulami, nejčastěji v kombinaci s mlecími technikami. Tento postup způsobí oslabení mezivrstevních vodíkových vazeb v 1:1 vrstvách a následné posunutí vrstev kaolinitu vůči sobě [7, 13]. Tyto malé organické molekuly lze rozdělit do tří skupin:

- sloučeniny typu močovina nebo formamid, které obsahují dvě odlišné skupiny schopné být akceptorem či donorem vodíku;
- sloučeniny s velkým dipólmomentem jako je dimethyl sulfoxid;
- NH_4^+ , K^+ , Rb^+ nebo Cs^+ soli mastných kyselin s krátkým řetězcem (acetát, propionát) [11, 14].

Delaminace kaolinitu močovinou může probíhat dvěma způsoby. Prvním z nich je míchání kaolinitu s roztokem močoviny a druhým je suché mletí kaolinitu s močovinou [7]. V práci [12] studovali vliv krátkodobého mletí kaolinitu/močovinového interkalátu a odlišných postupů exfoliace. Dvě zrnitostní frakce S5 ($<5 \mu\text{m}$) a S ($5 \mu\text{m} < S < 45 \mu\text{m}$) byly s využitím krátkodobého mletí interkalovány močovinou po dobu 48 h při 95°C . Močovina byla vymývána třemi postupy zahrnujícími termální proceduru, třepání při pokojové teplotě a působení ultrazvuku při pokojové teplotě. Výsledné vzorky byly odstředěny a promývány destilovanou vodou. Studium takto připravených vzorků ukázalo, že krátkodobé mletí a následné promývání při nízkých (pokojových) teplotách vede k důkladné exfoliaci/delaminaci kaolinitu. Dále, že rozsah degradace krystalové struktury kaolinitu závisí jak na koncentraci močoviny, tak na způsobu jejího vymývání. A v neposlední řadě že nejvyšší hodnoty SSA bylo dosaženo použitím vyšší koncentrace močoviny a následným promýváním při nízkých (pokojových) teplotách [12]. Autoři práce

[13] využili mechanochemické aktivace kaolinitu, kdy mleli směs kaolinitu a DMSO po určitou dobu v planetárním mlýně. Tímto postupem získali dobře exfoliovaný/delaminovaný kaolinit. Oproti tradičním metodám, kdy se nevyužívá mechanické aktivace (mletí), umožnila tato technika snížení reakční doby z řádů dnů na hodiny. Delaminace kaolinitu dosáhli v práci [15] pomocí interkalace octanem draselným a mletím v kulovém mlýně. Došlo tak ke zvýšení počtu částic ($< 1 \mu\text{m}$) a zvýšení SSA z 8 na $27 \text{ m}^2/\text{g}$.

3.3 Antibakteriální kompozity na bázi jílu

Vlastnosti, jako jsou možnost modifikace povrchu jílových minerálů, možnost interkalace látek do jejich struktury, výborné adsorpční vlastnosti, velký specifický povrch a levná dostupnost, vedou k využití jílových minerálů jako nosičů pro sloučeniny se schopností zabráňovat bakteriálnímu růstu. Rozvoj nových antibakteriálních materiálů na bázi jílu přitahuje pozornost vědců z celého světa, kteří se snaží připravit vhodnou lékovou formu pro lokální použití a navíc s dlouhodobým účinkem.

Mezi nejčastěji používané jílové minerály pro přípravu antibakteriálních kompozitů patří montmorillonit (MMT). MMT spadá do skupiny smektitů, je klasifikován jako koncový člen dioktaedrických smektitů s nízkým nábojem nebo bez náboje v tetraedrech. Jedná se o 2:1 jílový minerál [7]. Dalším jílovým minerálem použitelným pro přípravu antibakteriálních kompozitů je vermikulit (VER). VER je 2:1 dioktaedrický nebo trioktaedrický jílový minerál, který se od montmorillonitů liší větší hustotou náboje a lokalizací náboje ve struktuře na tetraedrech [7]. Jílový minerál kaolinit (1:1) byl k těmto účelům prozatím využit pouze sporadicky.

Z hlediska použité aktivní složky antibakteriálních kompozitů na bázi jílu lze tyto materiály rozdělit na anorganické či organické.

3.3.1 Anorganické antibakteriální kompozity na bázi jílu

Pro přípravu anorganických antibakteriálních jílových kompozitů se využívá kationtů těžkých kovů Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} s antibakteriálními vlastnostmi, které jsou zavedeny do jílové matrice iontovou výměnou. Výhodou anorganických materiálů je jejich vysoká tepelná stabilita. Nevýhodou je hromadění škodlivých těžkých kovů do pseudohexagonálních dutin silikátových vrstev, čímž dojde k následnému snížení antibakteriální aktivity [16].

Z uvedených kationtů je pro přípravu antibakteriálních kompozitů nejvíce používané stříbro, které má ve formě Ag^+ kationtů nejvyšší antibakteriální aktivitu. Nevýhodou

použití stříbra je jeho vysoká cena, dále nestabilita ve vodném prostředí a sklon k redukci na Ag^0 . Dále mají ionty Ag^+ schopnost reagovat s anionty (Cl^- , SH^- , SO_4^{2-} atd.) běžně se vyskytujícími ve vodě a vlhkém prostředí a s nimi tvořit nerozpustné sloučeniny, čímž ztrácí antibakteriální aktivitu [17]. Autoři práce [18] se věnovali studiu antibakteriální aktivity stříbrem modifikovaného montmorillonitu (MMT). Ag^+ MMT připravili tak, že různě upravený MMT (kalcinace nebo mletí) podrobili iontové výměně. Při antibakteriálních testech se stanovuje hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibakteriální látky, která kompletně inhibuje růst mikroorganismů [7]. Ag^+ MMT připravený z mletého MMT vykazoval nižší MIC než kompozit připravený z kalcinovaného MMT, jelikož pomletím došlo ke zvětšení SSA. Toto ukazuje na fakt, že antibakteriální účinnost je závislá na přímém kontaktu Ag^+ iontů s bakteriemi [18]. Přípravou nanočástic stříbra přímo v mezivrstvi MMT se zabývali v práci [19]. K MMT dispergovanému v *n*-hexanolu byl přidán vodný roztok AgNO_3 a následně roztok NaBH_4 jako redukční činidlo. V mezivrstvi MMT se tímto způsobem vysrážely nanočástice Ag. Tento materiál vykazoval silnou antibakteriální účinnost proti kmeni *E. coli*. Srovnání antibakteriálních účinků Ag^+ MMT a Ag^+ VER uvedli v práci [20]. Bylo zjištěno, že větší antibakteriální účinek má Ag^+ VER.

Nejen Ag^+ kationtů je možné využít pro přípravu antibakteriálních materiálů, ale také Cu^{2+} kationty vykazují antibakteriální chování. Zdrojem Cu^{2+} iontů jsou především sloučeniny CuSO_4 a $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Antibakteriální aktivita těchto sloučenin spočívá v přímém kontaktu Cu^{2+} iontů s bakteriemi ve vodě. Zvýšení antibakteriální aktivity tedy dosáhneme zvýšením počtu Cu^{2+} iontů, což však vede k ukládání nežádoucích sloučenin do životního prostředí [17]. I z tohoto důvodu existuje snaha absorbovat Cu^{2+} kationty do jílové matrice [17, 21].

Vzhledem k tomu, že antibakteriální kompozity na bázi kaolinitu nejsou prozatím příliš prozkoumaným odvětvím, existuje pouze několik publikací zabývajících se tímto tématem. Antibakteriální aktivitu kompozitního materiálu na bázi kaolinitu a TiO_2 (KAO/ TiO_2) studovali v práci [22]. Z prekursoru TiOSO_4 byly připraveny nanokompozity KAO/ TiO_2 s 20 nebo 40 hm% TiO_2 a ty byly dále buď sušeny při 105 °C, nebo kalcinovány při 600 °C. Kalcinace způsobila přeměnu kaolinitu na metakaolinit. Nejvyšší antibakteriální aktivitu vykazoval nekalcinovaný KAO/ TiO_2 se 40 hm% TiO_2 . Autoři práce předpokládají, že antibakteriální účinek vzorků je založen na interakci produktů fotokatalýzy s bakteriální buňkou.

V práci [23] připravili tepelnou a chemickou redukcí nanočástice stříbra na kaolinitu. V obou případech vykazoval připravený kompozitní materiál antibakteriální aktivitu proti

běžným gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím. Autoři práce zjistili, že nanočástice připravené na metakaolinitu mají větší průměr, než ty, které byly připravené na kaolinitu, což způsobilo o něco nižší antibakteriální aktivitu.

Efektivní antimikrobiální aktivitu proti bakterii *Staphylococcus aureus* vykazoval kompozitní materiál na bázi kaolinitu a nanočástic stříbra, který připravili v práci [24] postupnou (*angl. layer-by-layer*) depozicí.

Antibakteriální kompozit na bázi mědi a cetyltrimethylamonium (CTA) bromidem modifikovaného kaolinitu připravili v práci [25]. Nejvyšší antibakteriální aktivitu vykazoval CTA-CuKAO. Kombinace CTA a Cu v jílové matici by mohla být podle autorů vhodnou alternativou k antibakteriálním materiálům na bázi stříbra.

3.3.2 Organické antibakteriální kompozity na bázi jílu

Oproti anorganickým antibakteriálním materiálům vykazují ty organické jisté výhody. Hlavní výhodou je jejich organofilicita, snášenlivost s organickou maticí (textil, papír, barvy, polymery atd.) a větší schopnost zadržovat a ničit bakterie [16]. Nejčastější způsob přípravy antibakteriálních organických jílu je interkalace antibakteriálních látek (např. soli chlorhexidinu, chitosan, kvartérní amoniové soli) do mezivrstev [26], nebo adsorpce na povrch jílového minerálu [27].

Kvartérní amoniové soli, konkrétně cetylpyridinium (CP^+) chlorid, využili vědci v pracích [27, 28]. CP^+ MMT připravili iontovou výměnnou a zkoumali antibakteriální aktivitu proti kmenům *P. aeruginosa* a *S. aureus*, které jsou odolné vůči antibiotikům a u pacientů způsobují závažné infekce. Bylo zjištěno, že CP^+ MMT je aktivní pouze vůči kmenu *S. aureus*, navíc nebyla pozorována žádná desorpce CP^+ , tudíž veškerá antibakteriální aktivita je přisuzována CP^+ vázanému na povrch jílu. V podobné práci [29] byla stanovena antibakteriální aktivita CP^+ interkalovaného MMT (CP^+ MMT) a cetyltrimethylamoniem (CTA) interkalovaného MMT (CTA/MMT), která byla porovnávána s antibakteriální aktivitou samotných CP a CTA. Bylo zjištěno, že antibakteriální účinky CTA/MMT (resp. CP^+ MMT) jsou již po 24 hodinách o 18 (resp. 13) řádů nižší než účinky samotného CTA (resp. CP). To vedlo autory k závěru, že interkalace těchto látek do mezivrstev snižuje antibakteriální účinky, jelikož brání přímému kontaktu antibakteriální látky s bakteriemi.

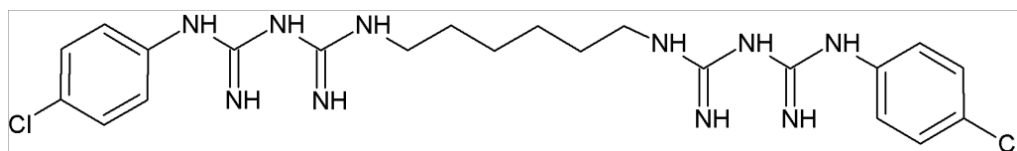
Další antibakteriální látkou využívanou k přípravě antibakteriálních organojílu je chlorhexidin. Chlorhexidin diacetát (CA) interkalovali do struktury MMT v rámci práce [30]. Antibakteriální testy ukázaly, že antibakteriální aktivita připraveného organojílu silně závisí na obsahu CA. Mimo jiné byla antibakteriální aktivita organojílu testována také

jeden rok po jeho přípravě a i po tomto dlouhém časovém intervalu materiál vykazoval dobrou antibakteriální aktivitu. Chlorhexidin diacetát (CA) byl použit také k modifikaci jílového minerálu vermikulitu (VER) [16]. Práce popisuje závislost antibakteriálního účinku na koncentraci CA. Všechny připravené vzorky vykazovaly dobrý bakteriostatický účinek, a vzorky s třemi nejvyššími koncentracemi mají dokonce účinek baktericidní. V práci [31] srovnávali antibakteriální aktivitu CA interkalovaného do různých monoionních forem VER a MMT (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}). Všechny připravené vzorky testovali proti kmenům *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Zatímco Cu^{2+} OVER a Cu^{2+} OMMT vykazovaly proti *E. faecalis* stejné účinky, Ag^+ OVER a Zn^{2+} OVER vykazovaly proti *E. faecalis* lepší antibakteriální aktivitu než Ag^+ OMMT a Zn^{2+} OMMT.

O antibakteriálních organokaolinitech doposud neexistují žádné studie.

3.4 Chlorhexidin

Chlorhexidin je kationaktivní biguanidin se silně bazickým charakterem. Samotný chlorhexidin je ve vodě těžce rozpustný. S kyselinami tvoří velmi stabilní soli jako chlorhexidin diacetát, diglukonát nebo dihydrochlorid. Jejich roztoky jsou bezbarvé, bez zápachu a mají hořkou chuť. Systematický vzorec chlorhexidinu je N,N-bis(4-chlorfenyl)-3,12-diimin-2,4,11,13-tetraazatetradekandiimidamid (Obr. 5) [32].



Obr. 5: Strukturní vzorec chlorhexidinu [33].

Chlorhexidin má širokospektrální biocidní účinky proti působení gram-pozitivních bakterií, nižší proti působení gram-negativních bakterií a proti plísním. Dále se ukázalo, že má účinnost proti mikroorganismům v ostatních formách, například proti bakteriálním sporám, také má in vitro aktivitu proti obalovým virům jako HIV, herpes apod. Působení chlorhexidinu také zabraňuje růstu a rozvoji biofilmů [32, 34].

V závislosti na koncentraci má chlorhexidin bakteriostatické (zabraňuje růstu bakterií) i baktericidní účinky (způsobí zabití bakterie). Jedná se o kladně nabitou molekulu, která se snadno váže k záporně nabitým fosfolipidům v buněčné stěně, což narušuje buněčnou membránu a způsobuje prasknutí buněčné stěny. Jakmile je buněčná stěna narušena, přechází chlorhexidin do buňky a narušuje semipermeabilní cytoplazmatickou membránu.

Narušení cytoplazmatické membrány vede k úniku cytoplazmy, koagulaci buněčných bílkovin a ke smrti bakteriální buňky. Na plísně působí chlorhexidin velmi podobným mechanismem. Jakmile plíseň chlorhexidin absorbuje, naruší se integrita buněčné stěny a plazmatické membrány, dochází k úniku cytoplazmy a následně k buněčné smrti.

Biofilm je tenká vrstva mikroorganismů rostoucí na pevném, organickém či anorganickém, podkladu. Biofilmy jsou charakteristické strukturní rozmanitostí, genetickou diverzitou, množstvím interakcí s mezibuněčnou hmotou polymerních látek. Mezibuněčná hmota buňku obklopuje a zvyšuje její rezistenci vůči antimikrobiálním látkám. Chlorhexidin má schopnost zabránit přilnutí mikroorganismů na povrch a tím brání růstu a vývoji biofilmu [32, 34].

Chlorhexidin byl poprvé syntetizován ve Velké Británii ve 40. letech minulého století. V dnešní době se používá ve více než 60 farmaceutických a zdravotnických prostředcích. V zubním lékařství je chlorhexidin nejúčinnější antiseptikum proti zubnímu plaku. Využívá se v kosmetických výrobcích a léčivech, jako jsou zubní pasty, ústní vody, intimní spreje, oční kapky, spreje k dezinfekci ran apod. Dlouhodobé využívání chlorhexidinu k léčbě ústní dutiny barví zuby a hřbet jazyka hnědě a vyvolává chuťové poruchy. Konvenční přípravky s chlorhexidinem obvykle poskytují pouze krátkodobou účinnost a pro udržení antibakteriální aktivity vyžadují opakované aplikace. Z tohoto důvodu je v poslední době kladen důraz na výzkum materiálů s jeho postupným kontrolovaným uvolňováním.

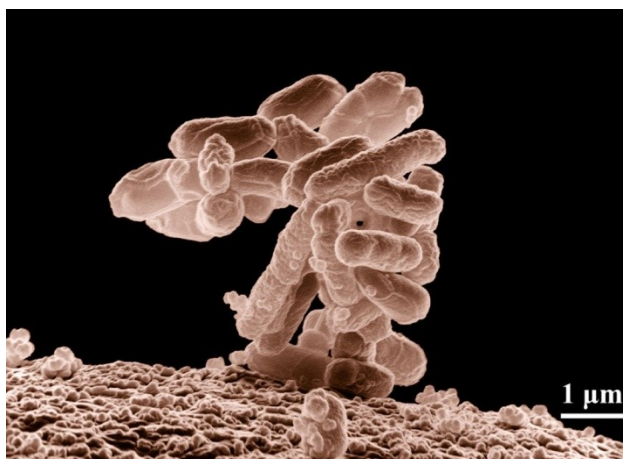
3.5 Vybrané mikrobiální kmeny

Mikroorganismy (mikroby) jsou jednobuněčné mikroskopické organismy, mezi které se řadí bakterie, plísně, kvasinky, archea a prvoci [35].

Bakterie, které jsou nejrozšířenější skupinou organismů na světě, dosahují velikostí od desetin do desítek mikrometrů a obvykle mívají kokovitý či tyčinkovitý tvar. Rozmnožují se binárním dělením. K taxonomickému rozdělení bakterií do dvou základních skupin (gram-negativní a gram-pozitivní) se využívá Gramova barvení, to je založeno na barvitelnosti bakteriálních buněk anilinovými barvivy. Pro gram-pozitivní bakterie je charakteristická modrofialová barva a pro gram-negativní červená [36, 37].

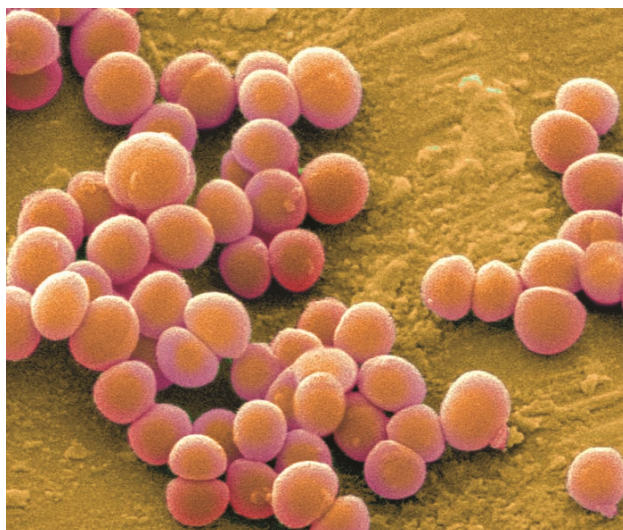
Mezi významného zástupce gram-negativních bakterií patří *Escherichia coli* (Obr. 6). Tato bakterie tyčinkovitého charakteru se pohybuje pomocí bičíků a žije v tlustém střevě teplokrevných živočichů. Její přítomnost je nezbytná pro správný průběh trávicích procesů ve střevě. Přestože produkuje řadu látek bránících rozšíření některých patogenních bakterií a podílí se na syntéze vitamínů K a B, může být také potenciálním patogenem. Vyskytuje-

li se v krevních cestách, je zdrojem tzv. bakteriémie. Je nejčastější příčinou kojeneckých enteritid a může postihovat močové a dýchací cesty [37].



Obr. 6: *Escherichia coli* [38].

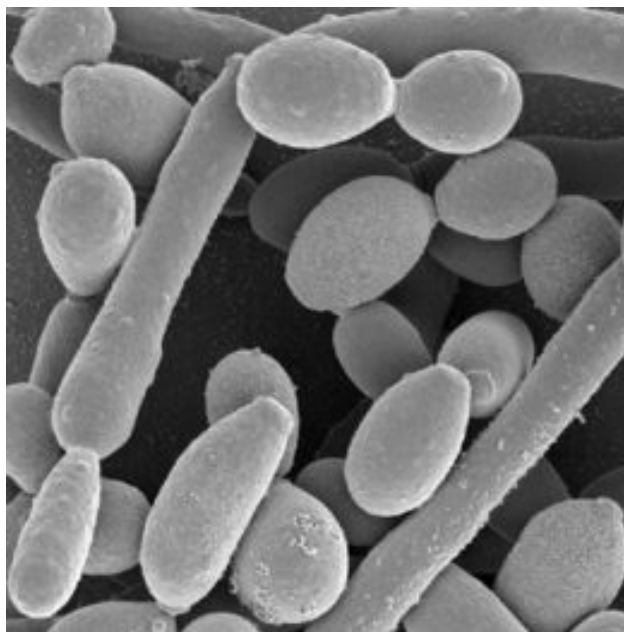
Zástupcem gram-pozitivních bakterií je *Staphylococcus aureus* neboli zlatý stafylokok. Jedná se o anaerobní nepohyblivý kok, jehož buňky mají velikost 0.7–0.9 μm a nejčastěji vytváří hroznovité shluky (Obr. 7). *S. aureus* produkuje řadu enzymů, jež se uplatňují v patogenezi stafylokokových onemocnění. Stejně jako *E. coli* způsobuje v krevním oběhu bakteriémii, dále je původcem kožních infekcí, syndromu toxického šoku, enterotoxikózy atd [37].



Obr. 7: *Staphylococcus aureus* [39].

Kvasinky, které se také řadí mezi mikrobiální kmeny, jsou jednobuněčné houbové mikroorganismy. V potravinářství se velmi často využívá jejich schopnosti kvašení (výroba piva, vína, chleba), některé druhy však mohou být původci nemocí [40].

Mezi patogenní druhy kvasinek patří mimo jiné i *Candida albicans* (Obr. 8). Jedná se o parazitickou kvasinku, která osidluje střeva, pohlavní ústrojí, ústa, jícen a krk. Za normálních podmínek žije v rovnováze s ostatními kvasinkami a bakteriemi v lidském organismu. Její přemnožení ale způsobuje oslabení imunitního systému a následně např. infekci zvanou kandidóza [41]. V ústech způsobuje častou tvorbu aft, bílý povlak na jazyku, nepříjemný zápach a chuť (tzv. moučnivka) [42].



Obr. 8: *Candida albicans* [43].

4 Experimentální část

4.1 Příprava antibakteriálních kompozitů

4.1.1 Použité chemikálie

Jako vstupní materiál byl použit jílový minerál kaolinit (KAO) z ložiska Sedlec. Ten byl pomlet na kulovém mlýnu Retsch (20 min, 300 rpm) a sítován na frakci pod 0.045 mm. Dále byly použity chemikálie: chlorhexidin dihydrochlorid (CH, $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2HCl$, Sigma Aldrich), dimethyl sulfoxid (DMSO, C_2H_6OS , Sigma Aldrich), metanol (CH_4O , Vitrum) a etanol (C_2H_6O , Vitrum) jako rozpouštědlo.

4.1.2 Exfoliace/delaminace kaolinitu pomocí DMSO

Úprava kaolinitu dimethyl sulfoxidem (DMSO) byla zvolena za účelem zvětšení mezivrstevní vzdálenosti kaolinitu.

KAO/DMSO byl připraven smícháním vždy 15 g KAO s 60 ml DMSO v Erlenmeyerově baňce. Uzavřená Erlenmeyerova baňka byla umístěna na elektromagnetickou míchačku. Roztok byl míchán po dobu 48 hodin při teplotě cca 60 °C. Po uplynutí této doby byl roztok odstředěn na centrifuze rychlostí 4000 ot/min po dobu 10 minut. Pevný podíl byl dále promíchán s metanolem a následně znovu odstředěn. Tento proces byl opakován celkem třikrát. Výsledný pevný podíl byl sušen při 80 °C přes noc. Vzniklý produkt byl označen jako KAO/DMSO.

4.1.3 Interkalace antibakteriální sloučeniny

Celkem byly připraveny dvě série kompozitů s chlorhexidinem dihydrochloridem (CH), jednak s původním KAO a dále s KAO/DMSO. V každé sérii byly připraveny vzorky lišící se hmotnostním poměrem jílového minerálu a CH (1:1, 2:1, 4:1). Proces modifikace organickou sloučeninou probíhal dle následujícího postupu:

Do 250 ml Erlenmeyerovy baňky byly naváženy 4 g příslušného jílového minerálu, ke kterému bylo přidáno 50 ml demineralizované vody. Do druhé 100 ml Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo odpovídající množství CH a 50 ml etanolu. Rozpuštěný CH byl následně kvantitativně převeden do 250 ml Erlenmeyerovy baňky s KAO či KAO/DMSO. Roztok byl umístěn na elektromagnetickou míchačku, za stálého míchání zahříván na teplotu 75 °C a následně za stálého míchání udržován při této teplotě po dobu 6 hodin. Po uplynutí 6 hodin byl roztok od pevného podílu oddělen centrifugací při 3000 ot/min

po dobu 15 minut. Pevný podíl byl vysušen při 80 °C. Označení připravených vzorků je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2: Označení připravených vzorků.

| jílový minerál | hmotnostní poměr jílového minerálu/CH | | |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------|
| | 1:1 | 2:1 | 4:1 |
| KAO | KAO_CH (1:1) | KAO_CH (2:1) | KAO_CH (4:1) |
| KAO/DMSO | KAO/DMSO_CH (1:1) | KAO/DMSO_CH (2:1) | KAO/DMSO_CH (4:1) |

4.2 Metody identifikace a jejich nástroje

Struktura připravených vzorků byla hodnocena pomocí metod rentgenové difrakce (RTG), infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a skenovací elektronové mikroskopie (SEM).

4.2.1 Rentgenová difrakční analýza

Rentgenová difrakční (RTG) fázová analýza byla provedena na rentgenovém difraktometru Ultima IV (RIGAKU) (uspořádání Bragg-Brentano, záření $\text{CuK}\alpha$) se scintilačním detektorem. Práškové vzorky byly vtlačeny do plochého skleněného držáku. Měření probíhalo v reflexním modu za konstantních podmínek 40 mA, 40 kV, $2,6^\circ/\text{min}$, rozsah měření $1.5\text{--}60^\circ 2\theta$.

4.2.2 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektra (IČE) připravených vzorků byla pořízena na přístroji NEXUS 470 s Fourierovou transformací. Vzorky byly měřeny ve formě KBr tablet. Spektrometr byl vybaven IR zdrojem Global, KBr beam splitterem a DTGS detektorem. Všechny vzorky byly změřeny při 128 skenech rozlišení 4 cm^{-1} v rozsahu $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$.

4.2.3 Skenovací elektronová mikroskopie

SEM snímky byly pořízeny pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Philips XL30. Měření probíhalo při urychlovacím napětí 25 kV, pro detekci signálu byl použit detektor sekundárních elektronů (SE) a snímky byly pořizovány při zvětšení $7500\times$.

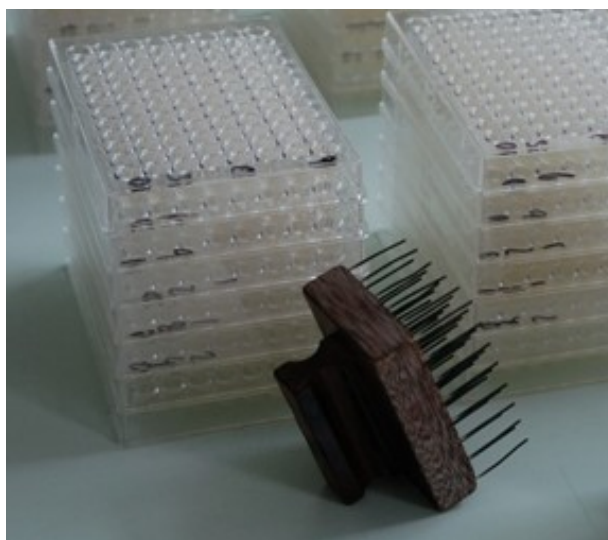
4.3 Antibakteriální testy

Testování antibakteriální aktivity připravených kompozitů bylo provedeno na půdě Zdravotního ústavu Ostrava, Centru klinických laboratoří.

4.3.1 Pracovní postup

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) připravených vzorků byla určena jako jejich nejnižší koncentrace, která zcela zabráňuje bakteriálnímu růstu.

Ředění a kultivace byly provedeny na mikrotitrační desce s 96 jamkami (Obr. 9). První série jamek obsahovala 10 % (w/v) vodné disperze příslušného vzorku. Tato disperze byla dále zředěna trojkovou zředovací metodou v glukózním základu tak, že série jamek od druhé do sedmé obsahovaly vzorek o koncentraci 3.33 %, 1.11 %, 0.37 %, 0.12 %, 0.04 % a 0.01 %. Osmá série obsahovala čistý roztok glukózy jako kontrolu. K různě koncentrovaným disperzím antibakteriálního kompozitu na mikrotitrační desce byl přidán pomocí inokulátoru (Obr. 9) 1 μ l glukózové suspenze příslušného kmene bakterií, *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (1.0×10^9 cfu ml⁻¹), *Escherichia coli* CCM 3954 (1.1×10^9 cfu ml⁻¹) a kvasinky *Candida albicans* ATC 90028 (1.2×10^9 cfu ml⁻¹), poskytnutých Českou sbírkou mikroorganismů (CCM). Bakteriální suspenze byla po uplynutí 30, 60, 90, 120, 180, 240 a 300 minut a poté během 5 dní vždy v 24 hodinových intervalech přenesena z každé jamky do 100 μ l čerstvého glukózního základu. Bakterie byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 a 48 hodin. Antibakteriální účinnost byla hodnocena vzniklým zákalem, který zobrazuje bakteriální růst.



Obr. 9: Mikrotitrační desky a inokulátor.

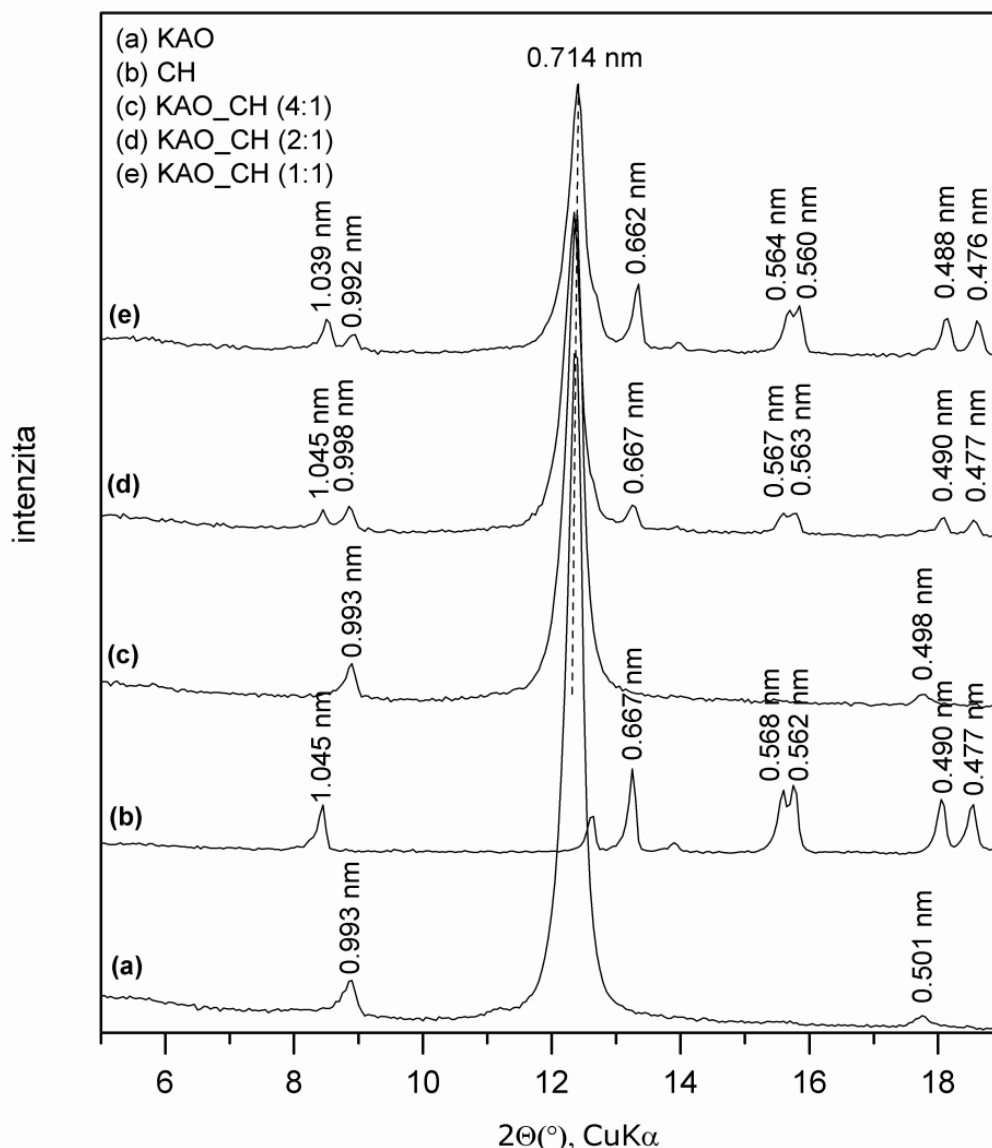
5 Výsledky a diskuze

5.1 Vyhodnocení struktury antibakteriálních kompozitů

5.1.1 Rentgenová difrakční analýza

U všech připravených vzorků byly změřeny difrakční záznamy. Na Obr. 10 jsou výsledky pro sérii organojílů připravených z původního KAO a na Obr. 11 vzorky organojílů připravených z KAO/DMSO.

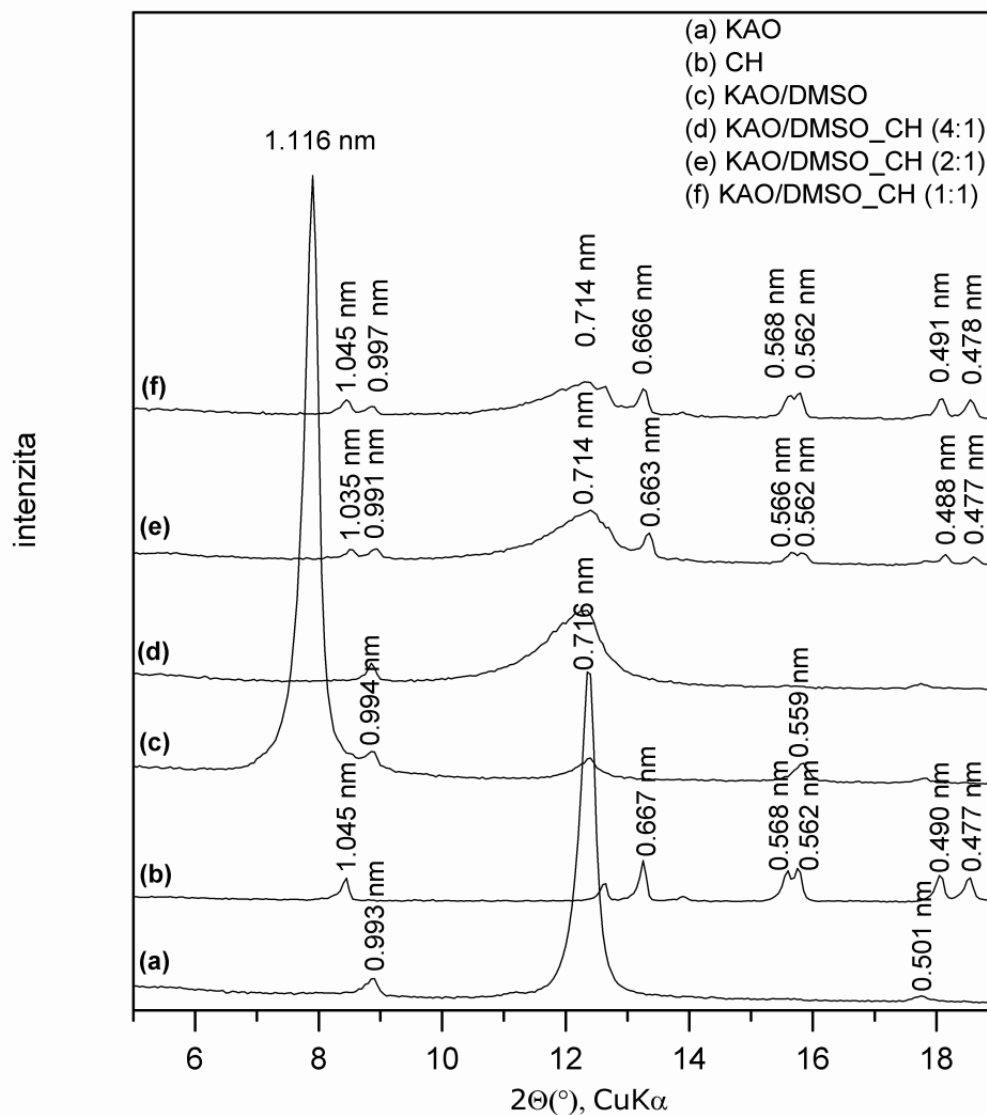
RTG difrakční záznam původního KAO (Obr. 10) ukazuje intenzivní bazální reflexi s hodnotou mezivrstevní vzdálenosti $d(001) = 0.714$ nm, která je charakteristická pro kaolinit. Dvě málo intenzivní reflexe s hodnotami mezivrstevní vzdálenosti $d = 0.993$ nm a 0.501 nm jsou přiřazeny reflexím slídy, která se vyskytuje v kaolinitu jako příměs [44]. RTG difrakční záznamy vzorků KAO_CH ve třech různých hmotnostních poměrech jílu a CH (Obr. 10c, d, e) ukazují s rostoucí koncentrací CH mírné snížení relativní intenzity (001) bazální reflexe KAO. Hodnota mezivrstevní vzdálenosti bazální reflexe KAO zůstala u všech vzorků nezměněna, tudíž nedošlo k interkalaci CH do mezivrství KAO. Také reflexe slídy zůstaly ve všech vzorcích zachovány. Na RTG difrakčních záznamech vzorků KAO_CH se objevují navíc reflexe CH použitého k interkalaci, a to s hodnotami mezivrstevní vzdálenosti 1.045 , 0.667 , 0.567 , 0.563 , 0.490 a 0.477 nm u vzorku KAO_CH 2:1 (Obr. 10d) a hodnotami 1.039 , 0.662 , 0.564 , 0.560 , 0.488 a 0.476 nm u vzorku KAO_CH 1:1 (Obr. 10e). U vzorku s nejnižší koncentrací aktivní složky KAO_CH 4:1 (Obr. 10c) tyto difrakční píky nejsou pozorovatelné z důvodu velmi nízké koncentrace, což by na první pohled vypovídalo o nepřítomnosti CH ve vzorku. Jeho přítomnost je ale jasně prokazatelná pomocí infračervené spektroskopie a na základě antibakteriálních testů.



Obr. 10: RTG záznamy vzorků: a) KAO, b) CH, c) KAO_CH (4:1), d) KAO_CH (2:1), e) KAO/DMSO_CH (1:1).

RTG difrakční záznam vzorku KAO/DMSO (Obr. 11c) ukazuje výraznou změnu difrakčního profilu původního KAO. Objevují se zde bazální reflexe prvního a druhého řádu s hodnotami mezivrstevní vzdálenosti $d(001) = 1.116$ nm a $d(002) = 0.559$ nm odpovídající mezivrstvím KAO interkalovaného s DMSO v monovrstevním uspořádání [45–47]. Zůstaly zde zachovány reflexe slídy a málo intenzivní (001) bazální reflexe KAO, což značí neúplnou interkalaci DMSO v mezivrstvím KAO. RTG difrakční záznamy vzorků KAO/DMSO_CH ukazují zánik bazálních reflexí (001) a (002) náležících interkalovanému DMSO. U těchto vzorků došlo k nárůstu a rozšíření profilu bazální (001) reflexe KAO. Relativní intenzita bazální reflexe KAO u vzorků KAO/DMSO_CH klesá s rostoucí koncentrací CH. Během interkalace KAO/DMSO s CH došlo k tzv. vymytí DMSO

z mezivrství KAO a vzniku méně uspořádané struktury KAO. U těchto vzorků, stejně jako u předchozích vzorků bez DMSO, nedošlo k interkalaci CH do mezivrství kaolinitu. Stejně jako u předchozí série můžeme u vzorků kompozitů s vyšším hmotnostním podílem CH (Obr. 11e, f) sledovat výskyt reflexí odpovídajících původnímu CH.



Obr. 11: RTG záznamy vzorků: a) KAO, b) CH, c) KAO/DMSO, d) KAO/DMSO_CH (4:1), e) KAO/DMSO_CH (2:1), f) KAO/DMSO_CH (1:1).

5.1.2 Infračervená spektroskopie

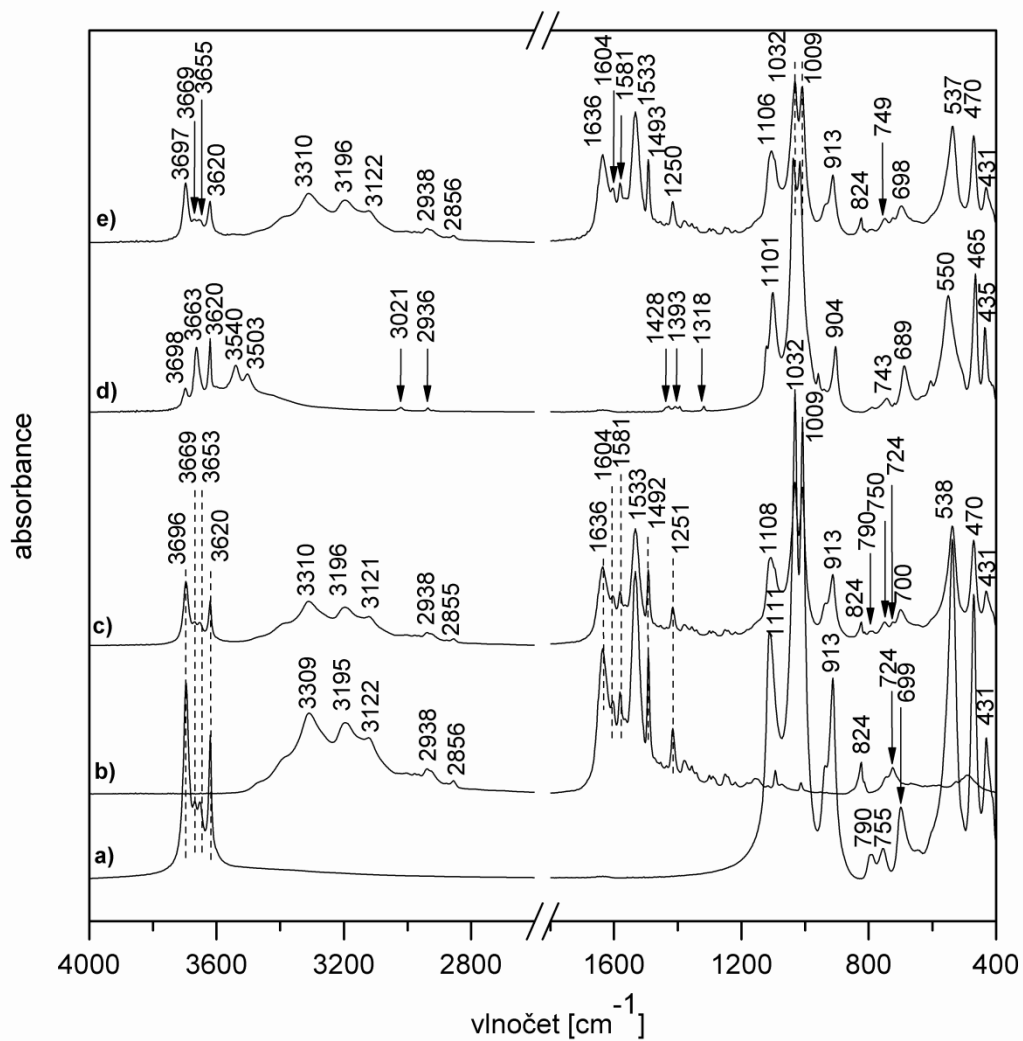
U všech připravených vzorků byla změřena jejich IČE spektra, na Obr. 12 jsou pak zobrazena spektra vybraných vzorků: a) KAO, b) CH, c) KAO_CH (1:1), d) KAO/DMSO a e) KAO/DMSO_CH (1:1). V Tabulce 3 jsou pro vzorky KAO, CH a KAO/DMSO shrnuty vlnočty nejvýznamnějších absorpčních pásů a zároveň jejich přiřazení k charakteristickým vibracím dle literatury [48-50]. Po přiřazení vlnočtů jednotlivých absorpčních pásů charakteristickým vibracím ze spekter těchto vstupních komponent můžeme dále usuzovat, zda a k jakým strukturním změnám dochází v případě spekter kompozitů.

Při porovnání IČE spekter KAO, CH a KAO_CH (1:1) vidíme, že se ve spektru KAO_CH (1:1) (Obr. 12c) nemění hodnoty vlnočtů valenčních a deformačních vibrací OH skupin a Si-O vazeb pocházejících z KAO. Mění se pouze jejich intenzita a šířka, což naznačuje jistou interakci mezi jílovým minerálem a antibakteriální sloučeninou. Zároveň se zde objevují absorpční pásy odpovídající valenčním vibracím N-H skupin, asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím C-H vazeb, deformačním vibracím N-H skupin, dále valenční vibrace C=C aromatických kruhů, což napovídá o přítomnosti CH [50]. Na základě nižší intenzity a mírného rozšíření absorpčních pásů, zejména odpovídajících valenčním vibracím OH skupin KAO a NH skupin CH, předpokládáme, že zřejmě dochází mezi těmito skupinami k vytvoření vodíkové vazby.

Ve spektru KAO/DMSO (Obr. 12d) se oproti spektru čistého KAO (Obr. 12a) objevují dva nové pásy (3540 a 3503 cm^{-1}), které odpovídají navázání molekuly DMSO k vnějším OH skupinám KAO [48].

V IČE spektru vzorku KAO/DMSO_CH (1:1) (Obr. 12e) můžeme vidět, že se zde již nevyskytují pásy charakterizující přítomnost DMSO jako u vzorku KAO/DMSO (Obr. 12d). Naopak je patrné, že DMSO byl následnou modifikací CH z mezivrství vymyt, což je také v souladu s výsledky z RTG difrakce. Ve spektru jsou nyní čitelné absorpční pásy charakteristických vibrací CH, stejně jako tomu bylo v případě KAO_CH (1:1) (Obr. 12c).

Ze získaných výsledků můžeme vyvodit závěr, že ačkoli jsme použili k exfoliaci/delaminaci vrstev kaolinitu sloučeninu DMSO, nedošlo v sérii vzorků KAO/DMSO_CH k výměně DMSO a navázání CH do mezivrství, ale na povrch jílu, stejně jako u vzorků série KAO_CH.



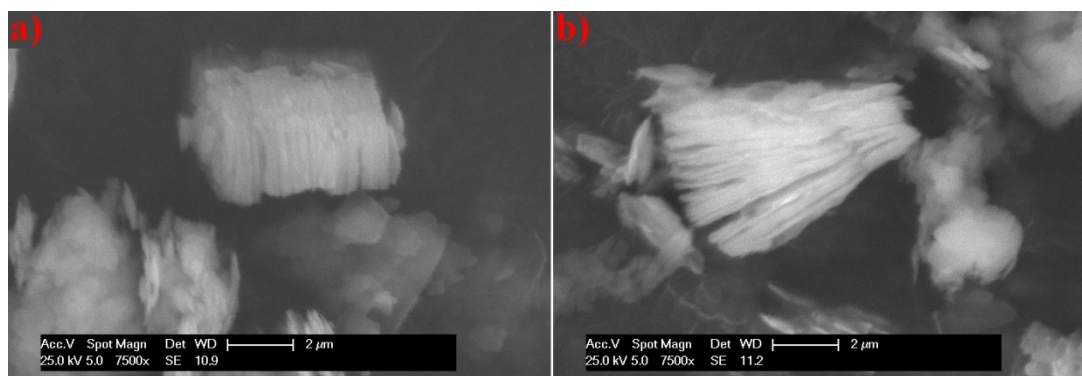
Obr. 12: IČE spektra vzorků: a) KAO, b) CH, c) KAO_CH (1:1), d) KAO/DMSO, e) KAO/DMSO_CH (1:1).

Tabulka 3: Nejvýznamnější vlnočty absorpčních pásů vzorků KAO, CH a KAO/DMSO a jejich přiřazení charakteristickým vibracím [48-50].

| | Vlnčet [cm^{-1}] | Charakteristická vibrace |
|----------|-----------------------------|--|
| KAO | 3696, 3669, 3653 | valenční vibrace OH skupin na vnitřním povrchu |
| | 3620 | valenční vibrace vnitřních OH skupin |
| | 1111 | Si-O symetrické valenční vibrace |
| | 1032, 1009 | Si-O asymetrické valenční vibrace |
| | 913 | deformační vibrace vnitřních OH skupin |
| | 790, 755, 699 | Si-O valenční vibrace |
| | 538 | Si-O-Al deformační vibrace |
| | 470 | Si-O-Si deformační vibrace |
| | 431 | Si-O deformační vibrace |
| | Vlnčet [cm^{-1}] | Charakteristická vibrace |
| CH | 3309, 3196, 3122 | valenční vibrace N-H skupin sek. aminů a iminů |
| | 2938 | asymetrické valenční vibrace C-H vazeb methylenových skupin |
| | 2856 | symetrické valenční vibrace C-H vazeb methylenových skupin |
| | 1636 | C=N valenční vibrace iminů |
| | 1604, 1581, 1533, 1492 | N-H deformační vibrace sek. aminů a iminů a valenční vibrace C=C skupin aromatických kruhů |
| | 1251 | valenční vibrace C-N skupin sek. aromatických aminů |
| | 824 | mimorovinná deformační vibrace C-H skupin aromatických kruhů |
| | 724 | kývavá deformační vibrace C-H vazeb methylenových skupin |
| | Vlnčet [cm^{-1}] | Charakteristická vibrace |
| KAO/DMSO | 3540, 3503 | valenční vibrace vazby mezi DMSO a OH skupinami vnitřního povrchu kaolinitu |
| | 3021 | asymetrické valenční vibrace C-H ₃ skupiny DMSO |
| | 2936 | symetrické valenční vibrace C-H ₃ skupiny DMSO |
| | 1428, 1393 | asymetrické deformační vibrace C-H ₃ skupiny DMSO |
| | 1318 | symetrické deformační vibrace C-H ₃ skupiny DMSO |

5.1.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Snímky pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem umožnily srovnání morfologie částic čistého kaolinitu s morfologií částic kaolinitu modifikovaného DMSO. Výsledné snímky (Obr. 13) ukazují morfologický vývoj částic KAO v důsledku interkalace. Na snímcích můžeme vidět, že vrstevnatá struktura kaolinitu zůstává po interkalaci zachována, ale jednotlivé vrstvy vzorku KAO/DMSO již nejsou v tak těsných vzdálenostech jako v původním KAO. Snímky nám tedy potvrzují, že modifikací kaolinitu DMSO bylo opravdu dosaženo požadovaného zvětšení mezivrstevních vzdáleností KAO.



Obr. 13: SEM snímky vzorků: a) KAO, b) KAO/DMSO.

5.2 Zhodnocení antibakteriálních testů

Antibakteriální aktivita připravených vzorků byla testována proti gram-pozitivnímu bakteriálnímu kmeni *Staphylococcus aureus*, gram-negativnímu bakteriálnímu kmeni *Escherichia coli* a kvasince *Candida albicans*. Získané výsledky hodnot MIC uvádí následující tabulky 4, 5 a 6 a pro lepší představu jsou výsledky ve vybraných časových intervalech (30 min, 60 min, 180 min, 300 min, 1 den, 5 dní) znázorněny na Obr. 14.

V případě gram-pozitivní bakterie *S. aureus* vykazují všechny vzorky obou sérií vynikající aktivitu po 24 h a delších časových intervalech. Hodnoty MIC klesají až na nejnižší koncentraci 0.01 % w/v (Tabulka 4, Obr. 14). V počáteční fázi expozice v minutových intervalech je možné pozorovat také dobrou aktivitu, ovšem již s nepatrnými rozdíly mezi oběma sériemi vzorků. Nejnižší aktivitu na počátku sledování vykazoval vzorek KAO/DMSO_CH (4:1).

U gram-negativního kmene *E. coli* pozorujeme obdobné výsledky jako v případě *S. aureus*. Opět bylo dosaženo vynikající aktivity v delších expozicích (Tabulka 5, Obr. 14).

Velice slibných výsledků bylo dosaženo při testování aktivity vzorků oproti kvasince *Candida albicans*. Nejenže můžeme pozorovat vynikající antimikrobiální aktivitu v dlouhých časových intervalech, ale připravené vzorky, obzvláště s vyšší koncentrací CH, jsou velice aktivní již v počátečních časech testování (Tabulka 6, Obr. 14). Navíc můžeme vidět, že série vzorků s DMSO je nepatrně účinnější.

Z výsledků je tedy patrné, že antibakteriální účinek připravených vzorků proti bakteriálním kmenům je odlišný než účinek proti kvasince. Zatímco u bakteriálních kmenů jsou hodnoty MIC po celých 300 minut přibližně ustáleny a klesají až v časovém úseku mezi 300 minutami a 24 hodinami (zde není aktivita pozorována z provozních důvodů laboratoře), u kvasinky klesají již v časovém úseku mezi 30–60 minutami. Dalším důležitým poznatkem je, že úprava KAO pomocí DMSO před navázáním CH neměla na výslednou antibakteriální aktivitu výrazný vliv.

Tabulka 4: *Staphylococcus aureus*.

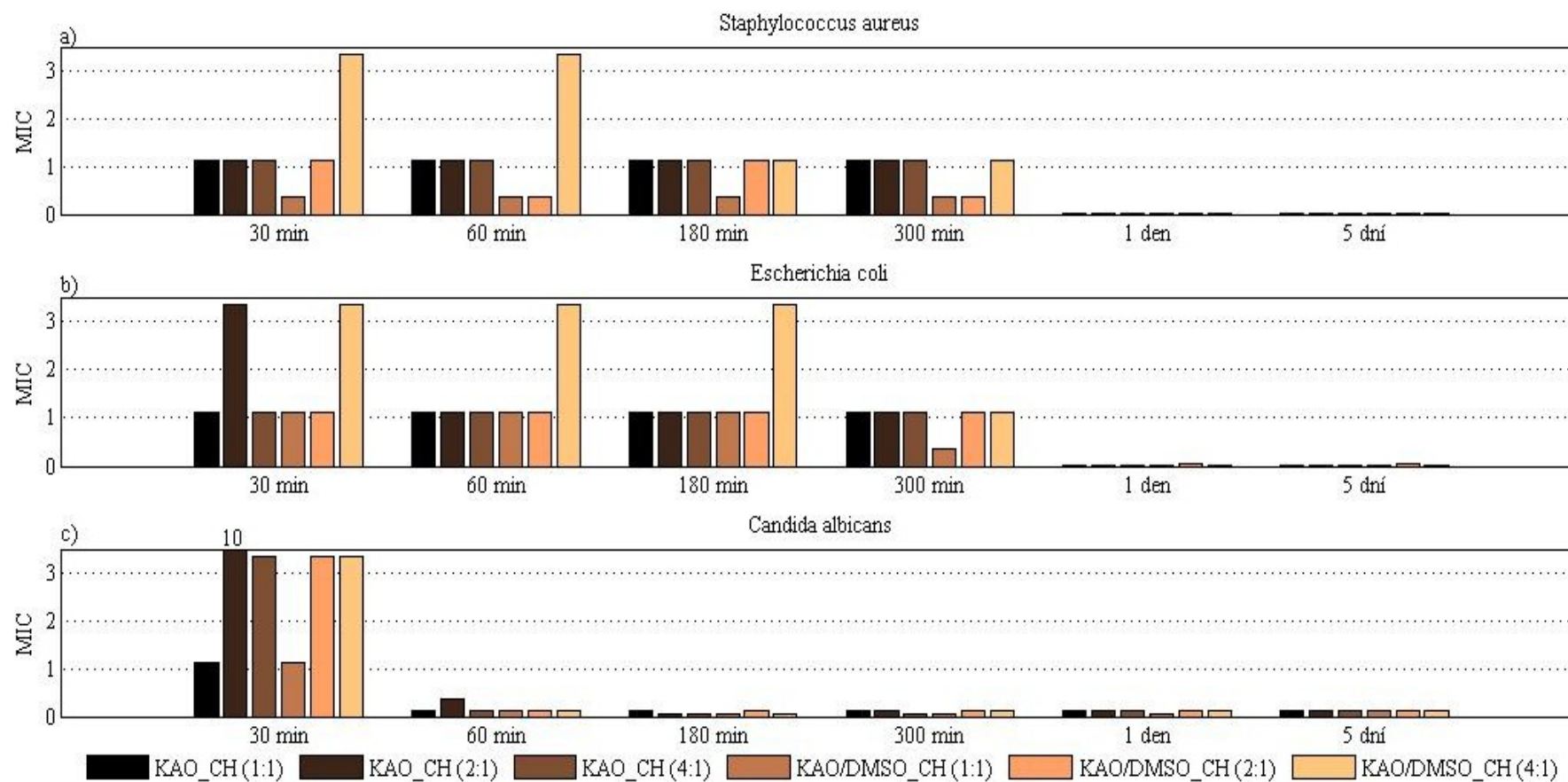
| vzorek/čas | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | 180 min | 240 min | 300 min | 24 hod | 2 dny | 3 dny | 4 dny | 5 dní |
|-------------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|-------|-------|-------|-------|
| KAO_CH (1:1) | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| KAO_CH (2:1) | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 0.37 | 1.11 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| KAO_CH (4:1) | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| KAO/DMSO_CH (1:1) | 0.37 | 0.37 | 0.37 | 1.11 | 0.37 | 0.37 | 0.37 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| KAO/DMSO_CH (2:1) | 1.11 | 0.37 | 0.37 | 0.37 | 1.11 | 0.37 | 0.37 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| KAO/DMSO_CH (4:1) | 3.33 | 3.33 | 3.33 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

Tabulka 5: *Escherichia coli*.

| vzorek/čas | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | 180 min | 240 min | 300 min | 24 hod | 2 dny | 3 dny | 4 dny | 5 dní |
|-------------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|-------|-------|-------|-------|
| KAO_CH (1:1) | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 0.37 | 1.11 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| KAO_CH (2:1) | 3.33 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| KAO_CH (4:1) | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| KAO/DMSO_CH (1:1) | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 0.37 | 0.37 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| KAO/DMSO_CH (2:1) | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 1.11 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 |
| KAO/DMSO_CH (4:1) | 3.33 | 3.33 | 3.33 | 3.33 | 3.33 | 3.33 | 1.11 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

Tabulka 6: *Candida albicans*.

| vzorek/čas | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | 180 min | 240 min | 300 min | 24 hod | 2 dny | 3 dny | 4 dny | 5 dní |
|-------------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|-------|-------|-------|-------|
| KAO_CH (1:1) | 1.11 | 0.37 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.04 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| KAO_CH (2:1) | 10 | 1.11 | 0.37 | 0.12 | 0.04 | 0.01 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| KAO_CH (4:1) | 3.33 | 0.37 | 0.12 | 0.12 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| KAO/DMSO_CH (1:1) | 1.11 | 0.04 | 0.12 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| KAO/DMSO_CH (2:1) | 3.33 | 1.11 | 0.12 | 0.04 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| KAO/DMSO_CH (4:1) | 3.33 | 1.11 | 0.12 | 0.04 | 0.04 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |



Obr. 14: Hodnoty MIC ve vybraných časových intervalech pro jednotlivé bakteriální kmeny a kvasinku.

6 Závěr

Předmětem bakalářské práce byla příprava kompozitních materiálů chlorhexidin (antibakteriálně aktivní látka)/kaolinit (nosná matrice), následné zhodnocení jejich struktury metodami rentgenové difrakční analýzy (RTG), infračervené spektroskopie (IČE), skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) a především stanovení a porovnání jejich antibakteriální aktivity.

Pro přípravu antibakteriálních kompozitů byly použity dva odlišné postupy. V prvním případě byl vstupní kaolinit (KAO) přímo modifikován antibakteriální sloučeninou chlorhexidinem dihydrochloridem (CH), přičemž RTG difrakční záznamy a IČE spektra ukazují, že chlorhexidin byl s největší pravděpodobností navázán na povrch kaolinitu.

Ve druhém případě byl vstupní kaolinit nejprve modifikován DMSO a následně chlorhexidinem. Modifikace pomocí DMSO byla provedena za účelem zvětšení mezivrstevní vzdálenosti jílového minerálu, což mělo umožnit vstup molekuly chlorhexidinu přímo do mezivrství kaolinitu. Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a RTG difrakční záznam vzorku KAO/DMSO potvrzují, že k rozšíření mezivrstevní vzdálenosti kaolinitu vlivem modifikace DMSO opravdu došlo, ale dále nám RTG difrakční záznamy kompozitních materiálů KAO/DMSO_CH (1:1), (2:1) a (4:1) ukazují, že po interakci s chlorhexidinem došlo k vymytí DMSO, navrácení hodnoty mezivrstevní vzdálenosti k původní hodnotě a vzniku méně uspořádané struktury kaolinitu. Fakt, že chlorhexidin nebyl ve vzorcích kompozitu s nosnou matricí KAO/DMSO interkalován do mezivrství, ale pouze vázán na povrch kaolinitu potvrzují také záznamy z infračervené spektroskopie (IČE).

Antibakteriální účinnost připravených vzorků byla stanovena pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace organojílů, která zcela zabraňuje bakteriálnímu růstu. Tyto testy potvrdily, že všechny připravené kompozitní materiály vykazují velmi dobrou účinnost proti oběma bakteriálním kmenům *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* a také proti kvasince *Candida albicans*. Bylo však zjištěno, že antibakteriální účinek připravených vzorků proti bakteriálním kmenům je odlišný než účinek proti kvasince. Zatímco u obou bakteriálních kmenů došlo k významnému snížení hodnot MIC až v delších časových intervalech (mezi 300 min a 24 h), u kvasinky významněji klesaly hodnoty MIC již po 30 minutách. Při porovnání výsledků testů pro obě série připravených organojílů je patrné, že úprava KAO pomocí DMSO před navázáním CH neměla na výslednou antibakteriální aktivitu výrazný vliv.

Výsledky práce napovídají o možnosti využití připravených kompozitů pro přípravu léčiv s dlouhodobým účinkem, ve vhodné lékové formě využitelné především pro léčbu infekcí dutiny ústní.

7 Literatura

- [1] WEISS, Z.; KUŽVART, M. *Jílové minerály: jejich nanostruktura a využití*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2005, 281 s. ISBN 80-246-0868-5.
- [2] MENTÍK, P. Stručný úvod do pedologie a pedografie pro pedografy. [online]. [cit. 2013-10-27]. Jílové minerály. Dostupné z WWW: <http://www.kge.zcu.cz/vyuka2/pudy_uvod.pdf>.
- [3] GUGGENHEIM, S.; MARTIN, R. T. Definition of clay and clay mineral: joint report of the AIPEA nomenclature and CMS nomenclature committees. *Clays and clay minerals*, 1995, 43.2: 255-256.
- [4] ČECH BARABASZOVÁ, K. *Nanotechnologie a nanomateriály*. Vyd. 1. Ostrava: Tiskárna Schenk, 2006, 158 s. ISBN 80-248-1210-X.
- [5] ZOLTAI, T. Classification of silicates and other minerals with tetrahedral structures. *American Mineralogist*, 1960, 45.9-10: 960-973.
- [6] *Mineralogie.sci.muni.cz* [online]. [cit. 2013-12-04]. Fylosilikáty. Dostupné z WWW: <http://mineralogie.sci.muni.cz/kap_7_13_fylosil/obrazek713_1.htm>.
- [7] VALÁŠKOVÁ, M. *Vybrané vrstevnaté silikáty a jejich modifikované nanomateriály*. Vyd. 1. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012, 148 s. ISBN 978-80-7204-811-3.
- [8] ČÍČEL, B.; NOVÁK, I.; HORVÁTH, I. *Mineralógia a kryštalochémia ílov*. Veda, 1981.
- [9] *Mineralogie.sci.muni.cz* [online]. [cit. 2013-12-04]. Fylosilikáty. Dostupné z WWW: <http://mineralogie.sci.muni.cz/kap_7_13_fylosil/obrazek713_5.htm>.
- [10] *The Cooperative Soil Survey* [online]. 2014 [cit. 2014-04-22]. Soil Texture - Physical Properties. Dostupné z WWW: <<http://soils.missouri.edu/tutorial/page8.asp#>>.
- [11] CHENG, H., et al. The thermal behavior of kaolinite intercalation complexes-A review. *Thermochimica Acta*, 2012, 545: 1-13.
- [12] VALÁŠKOVÁ, M., et al. Exfoliation/delamination of kaolinite by low-temperature washing of kaolinite–urea intercalates. *Applied Clay Science*, 2007, 35.1: 108-118.
- [13] SUN, D., et al. Characterization of exfoliated/delamination kaolinite. *Materials Research Bulletin*, 2011, 46.1: 101-104.
- [14] OLEJNIK, S.; POSNER, A. M.; QUIRK, J. P. The intercalation of polar organic compounds into kaolinite. *Clay Minerals*, 1970, 8.4: 421-434.

- [15] CHENG, H., et al. Delamination of kaolinite–potassium acetate intercalates by ball-milling. *Journal of colloid and interface science*, 2010, 348.2: 355-359.
- [16] HOLEŠOVÁ, S., et al. Preparation of novel organovermiculites with antibacterial activity using chlorhexidine diacetate. *Journal of colloid and interface science*, 2010, 342.2: 593-597.
- [17] ZHOU, Y., et al. Antimicrobial ability of Cu^{2+} -montmorillonite. *Applied clay science*, 2004, 27.3: 215-218.
- [18] MAGANA, S. M., et al. Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2008, 281.1: 192-199.
- [19] MIYOSHI, H., et al. Characterization and photochemical and antibacterial properties of highly stable silver nanoparticles prepared on montmorillonite clay in n-hexanol. *Journal of colloid and interface science*, 2010, 345.2: 433-441.
- [20] VALÁŠKOVÁ, M., et al. Preparation and characterization of antibacterial silver/vermiculites and silver/montmorillonites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2010, 74.22: 6287-6300.
- [21] DRELICH, J., et al. Vermiculite decorated with copper nanoparticles: Novel antibacterial hybrid material. *Applied Surface Science*, 2011, 257.22: 9435-9443.
- [22] DĚDKOVÁ, K., et al. Study of the antibacterial activity of composites kaolinite/ TiO_2 . In: *Nanocon 2012*, Brno
- [23] CABAL, B., et al. Heterogeneous precipitation of silver nanoparticles on kaolinite plates. *Nanotechnology*, 2010, 21.47: 475705.
- [24] BURRIDGE, K.; JOHNSTON, J.; BORRMANN, T. Silver nanoparticle–clay composites. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21.3: 734-742.
- [25] Malek, N. A. N. N., Ishak, S. A., Kadir, M. R. A. Antibacterial Activity of Copper and CTAB Modified Clays against *Pseudomonas aeruginosa*. *Advanced Materials Research*, 2013, 626: 178-182.
- [26] NIEN, Yung-Tang; LIAO, Yi-Han; LIAO, Pao-Chi. Antibacterial activity of poloxamer-modified montmorillonite clay against *E. coli*. *Materials Letters*, 2011, 65.19: 3092-3094.
- [27] ÖZDEMİR, G.; YAPAR, S.; LIMONCU, M. H. Preparation of cetylpyridinium montmorillonite for antibacterial applications. *Applied Clay Science*, 2013, 72: 201-205.

- [28] ÖZDEMİR, G., et al. The antibacterial effect of heavy metal and cetylpyridinium-exchanged montmorillonites. *Applied Clay Science*, 2010, 48.3: 319-323.
- [29] MALACHOVÁ, K., et al. Activity of antibacterial compounds immobilised on montmorillonite. *Applied Clay Science*, 2009, 43.3: 364-368.
- [30] HE, H., et al. A novel organoclay with antibacterial activity prepared from montmorillonite and Chlorhexidine Acetate. *Journal of colloid and interface science*, 2006, 297.1: 235-243.
- [31] HOLEŠOVÁ, S., et al. Antibacterial activity of organomontmorillonites and organovermiculites prepared using chlorhexidine diacetate. *Applied Clay Science*, 2013, 83: 17-23.
- [32] *Chlorhexidine facts* [online]. 2012 [cit. 2013-11-14]. Chlorhexidine. Dostupné z WWW: <<http://www.chlorhexidinefacts.com/>>.
- [33] SAMLÍKOVÁ, M. *Příprava organojílů s antibakteriálními vlastnostmi*. Ostrava, 2010. Diplomová práce. VŠB-TUO.
- [34] *KVABpharm - Pharmaceutical Company* [online]. c2008-2013 [cit. 2014-04-29]. Chlorhexidine. Dostupné z WWW: <<http://www.kvabpharm.com/en/social>>
- [35] *Biology Online* [online]. [cit. 2014-04-29]. Microorganism. Dostupné z WWW: <<http://www.biology-online.org/dictionary/Microorganism>>.
- [36] *Bakterie* [online]. c 2013 [cit. 2014-04-29]. Bakterie. Dostupné z WWW: <<http://www.bakterie.eu/>>.
- [37] KAČALOVÁ, M. *Vliv rozdílů v parametrech Gramova barvení na výslednou barevnost bakterií*. Brno, 2007. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně.
- [38] Microorganism. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2014-04-29]. E. Coli. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Mikroorganismus#mediaviewer/Soubor:E_coli_at_10000x%2C_original.jpg>.
- [39] Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Bioquell* [online]. c 2014 [cit. 2014-04-29]. Staphylococcus aureus. Dostupné z WWW: <<http://www.bioquell.com/technology/microbiology/methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-mrsa/>>.
- [40] Kvasinky. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2014 [cit. 2014-04-29]. Kvasinka. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Kvasinky>>.

- [41] *Doktorka.cz* [online]. c 2014 [cit. 2014-04-30]. Candidóza. Dostupné z WWW: <<http://nemoci.doktorka.cz/candidoza/>>.
- [42] *Vitalion* [online]. c 2014 [cit. 2014-04-30]. Kvasinková infekce. Dostupné z WWW: <<http://nemoci.vitalion.cz/kvasinkova-infekce/>>.
- [43] NEAL, J. Treatment for Candida and Symptoms of Candida Yeast Overgrowth. In: *Hubpages* [online]. c 2014 [cit. 2014-04-29]. Dostupné z: <<http://jeffreynecal.hubpages.com/hub/treatment-for-candida-and-symptoms-of-candida-overgrowth#>>.
- [44] MITROVIĆ, A.; ZDUJÍČ, M. Mechanochemical treatment of Serbian kaolin clay to obtain a highly reactive pozzolana. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2013, 78.4.
- [45] OLEJNIK, S., et al. Infrared spectra of kaolin mineral-dimethyl sulfoxide complexes. *The Journal of Physical Chemistry*, 1968, 72.1: 241-249.
- [46] MATUSIK, J.; SCHOLTZOVÁ, E.; TUNEGA, D. Influence of synthesis conditions on the formation of a kaolinite-methanol complex and simulation of its vibrational spectra. *Clays and Clay Minerals*, 2012, 60.3: 227-239.
- [47] MBEY, Jean-Aimé; HOPPE, S.; THOMAS, F. Cassava starch–kaolinite composite film. Effect of clay content and clay modification on film properties. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88.1: 213-222.
- [48] YANG, Shu-qin, et al. Effect of reaction temperature on grafting of γ -aminopropyl triethoxysilane (APTES) onto kaolinite. *Applied Clay Science*, 2012, 62: 8-14.
- [49] MBEY, J. A., et al. An insight on the weakening of the interlayer bonds in a Cameroonian kaolinite through DMSO intercalation. *Applied Clay Science*, 2013, 83: 327-335.
- [50] SOCRATES, George, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts*, Vyd. 3, Chichester: John Wiley & Sons Inc., 2001, 366 s. ISBN 978-0-470-09307-2.